

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月16日現在

機関番号：14501  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790336  
 研究課題名（和文） PIP3ホスファターゼSKIPを標的とした生体内骨格筋量の増強  
 研究課題名（英文） Increase in skeletal muscle amount by an attenuation of PIP3 phosphatase SKIP  
 研究代表者  
 伊集院 壮（IJUIN TAKESHI）  
 神戸大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：00361626

## 研究成果の概要（和文）：

Skeletal muscle and kidney enriched inositol polyphosphate 5-phosphatase (SKIP)は、骨格筋におけるインスリン様増殖因子(IGF-1)シグナルを負に制御することによって、骨格筋細胞の増強を負にコントロールすることを明らかにした。これは、SKIPがPI3キナーゼシグナルを負に制御することによって由来している。SKIPヘテロノックアウトマウスにおいても骨格筋量の増加が認められることから、SKIPは骨格筋を萎縮に向かわせる因子であることが示唆された。さらに我々は今回、SKIPによる効率的なPI3キナーゼシグナルの抑制の分子メカニズムを明らかにした。がん悪液質などの筋萎縮を伴う重篤な疾患の治療やQuality of Lifeの向上に向けてSKIPは新たな治療ターゲットとなることが期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we revealed that skeletal muscle and kidney enriched inositol polyphosphate 5-phosphatase (SKIP) negatively regulated insulin-like growth factor (IGF)-1 signal in the skeletal muscle. SKIP inhibited IGF-1 mediated protein synthesis and hypertrophy through the negative regulation of PI 3-kinase signaling pathway. Together with the results that SKIP heterozygous knockout mice exhibited increased amount of tibialis anterior skeletal muscle, SKIP is likely to be a key factor that trigger hypotrophy of skeletal muscle. Thus, SKIP may be a promising target for the intervention of hypotrophy accompanied by several severe diseases including cancer cachexia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：骨格筋・PI3キナーゼ・SKIP・IGF-1・筋量増強

## 1. 研究開始当初の背景

我々人間が生活を営む上で、骨格筋の

運動はなくてはならないものである。筋萎縮による骨格筋低下は、歩行や摂食などの基本的な運動を妨げ、我々の

Quality of Life (QOL)を低下させる。がん・糖尿病、および感染症に伴う筋萎縮は悪液質など致死にいたる重篤な症状を引き起こすことから、骨格筋量を維持、あるいは増強させることは不可欠であると考えられる。しかし、筋萎縮に対する効果的な薬剤は未だ開発に至っていない。我々の運動能力の向上や QOL の維持の為にも、骨格筋の増強は喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

Skeletal muscle and kidney enriched inositol polyphosphate 5-phosphatase (SKIP)は、PIP3 の脱リン酸化を介してインスリンシグナルを負に制御する分子である (Ijuin and Takenawa, 2003)。SKIP ヘテロノックアウトマウスは高いインスリン感受性を示し、高血糖症になりにくいことから SKIP は糖尿病治療の新しい標的分子であることが期待されている (Ijuin et al. 2008)。一方で、SKIP ヘテロノックアウトマウスの骨格筋量が上昇していた。これは SKIP が生体内の骨格筋量をコントロールしていることを示唆している。本研究では、SKIP が骨格筋細胞への分化やタンパク質合成に及ぼすかどうか、また SKIP が新しい筋萎縮に対する薬剤標的となり得るかを明らかにすることを目的とし、SKIP が骨格筋量をコントロールするメカニズムの検討を行った。

## 3. 研究の方法

① SKIP による IGF-1 シグナル伝達制御分子メカニズムの解析  
マウス骨格筋由来 C2C12 細胞を用いて、SKIP との結合分子の探索を行った。細胞内に SKIP を発現させ、免疫沈降によって単離された SKIP を含むタンパク質複合体の構成分子を質量分析装置によって単離した。また SKIP の過剰発現や発現抑制による IGF-1 シグナルへの影響の検討を行った。

② SKIP による前駆細胞から骨格筋への分化誘導の制御機構の解析  
SKIP の過剰発現系や発現抑制系を用いて、単核の骨芽細胞から多核の筋管細胞への分化・細胞融合に及ぼす SKIP の影響を検討する。

③ 生体内骨格筋量に対する SKIP の影

響—SKIP ヘテロノックアウトマウスにおける骨格筋量の検討  
実際にマウス生体内で SKIP が骨格筋量に及ぼす影響を検討するために、マウス骨格筋に対して *in vivo* での SKIP 遺伝子導入を行い、骨格筋量や筋管の大きさに及ぼす影響を検討する。また、SKIP ヘテロノックアウトマウスに対しても同様の検討を行う。

④ マウス骨格筋再生に対する SKIP の影響の検討

骨格筋細胞は常に、再生と分解を繰り返している。従って、骨格筋の筋量低下には筋再生の低下が関与している。マウス骨格筋に SKIP 遺伝子を導入し、筋再生過程の変化を検討する。さらに、再生された筋肉の組織学的な検討を行う。

## 4. 研究成果

① SKIP はインスリンや IGF-1 シグナルにおいて Akt2 を効率よく不活性化する機構を持つ。

SKIP の骨格筋細胞における結合分子を探索した結果、インスリンや IGF-1 刺激依存的に p21-activated protein kinase (Pak1) と結合することが明らかとなった。SKIP は刺激依存的に細胞膜に移行し、Pak1 と結合する。Pak1 はキナーゼとしてのみならず、scaffold タンパクとして機能することも知られている。Pak1 は活性化された際に構造変化を起こし、Akt や PDK1 と複合体を形成する。SKIP は刺激依存的に Pak1 を介して Akt2 や PDK1 と複合体を形成することによって、これらの分子に結合する PIP3 を効率的に脱リン酸化するが、これが SKIP による PI3 キナーゼの速やかな脱リン酸化に寄与していることが明らかとなった (Ijuin and Takenawa, *Mol. Cell. Biol.*, 2012)。

② SKIP は IGF の産生を抑制することによって骨格筋分化を負に制御する  
骨格筋分化には PI3 キナーゼシグナルの活性化とその下流での IGF の自己産生が必要であることが分かっている。SKIP はこの IGF 産生を抑制することによって骨格筋分化を負に制御していることが明らかとなった (Ijuin and Takenawa, *J. Biol. Chem.*, 2012)。

③ SKIP は骨格筋細胞の大きさを負に

コントロールする  
マウス骨格筋由来 C2C12 細胞に SKIP siRNA を遺伝子導入し分化誘導を行ったところ、多核の筋管細胞への分化が確認されたが、細胞の面積の増加や細胞当たりの核の数の上昇が認められた。これは SKIP が IGF-1 シグナルを抑制することによって骨格筋でのタンパク質合成を負に制御していることを表している。

④ SKIP の発現抑制は生体内での骨格筋量の増加を誘導する  
マウス骨格筋での SKIP の発現抑制および SKIP ヘテロノックアウトマウスでは、ヒラメ筋や腓腹筋の質量の増加が認められた。これは SKIP が生体内で骨格筋量の調節を行っていることを表している。

⑤ PIP3 ホスファターゼによるインスリンシグナルの抑制は SKIP 特異的である。  
これまでの結果から、SKIP はインスリンシグナルを効率的に抑制することが明らかになった。この効果を他の PIP3 ホスファターゼと比較検討したところ、PTEN や SHIP2 と比べて大きな効果が認められた。これは SKIP が PIP3 ホスファターゼの中でも特異的にインスリンシグナルを制御する分子であることを表している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) 伊集院 壮、竹縄 忠臣、Role of Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) 5-phosphatase, skeletal muscle and kidney enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP) in myoblast differentiation. Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol. 287、2012、No. 37、31330-31341、doi: 10.1074/jbc.M112.388785.

(2) 伊集院 壮、竹縄 忠臣、Regulation of insulin signaling by the phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate phosphatase SKIP through the scaffolding function of Pak1、Molecular and

Cellular Biology、査読有、Vol. 32、2012、No. 17、3570-3584、doi: 10.1128/MCB.00636-12.

(3) 伊集院 壮、竹縄 忠臣、Regulation of insulin signaling and glucose transporter (GLUT4) exocytosis by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) phosphatase, skeletal muscle, and kidney enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP)、Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol. 287、2012、No. 10、6991-6999、doi:10.1074/jbc.M111.335539.

(4) 王 峰、伊集院 壮、伊藤 俊樹、竹縄 忠臣、Regulation of IGF-1/PI3K/Akt signaling by the phosphoinositides phosphatase pharbin、査読有、Vol. 150、2011、No. 1、83-93、doi: 0.1093/jb/mvr037.

〔学会発表〕(計 4 件)

① 伊集院 壮、竹縄 忠臣、「PIP3 ホスファターゼSKIPによるインスリンシグナル特異的な制御」  
第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 15 日、福岡

② 伊集院 壮、竹縄 忠臣、「PIP3 ホスファターゼSKIPの膜ラフリングへの局在と GLUT4 小胞の細胞膜融合の制御」  
第 84 回日本生化学会、2011 年 9 月 24 日、神戸

③ 伊集院 壮、竹縄 忠臣、「GRP78 による PIP3 ホスファターゼSKIPの制御を介したインスリン作用の制御」  
第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 12 日、名古屋

④ 伊集院 壮、竹縄 忠臣、「Spatiotemporal regulation of insulin signaling by PIP3 phosphatases」  
第 63 回日本細胞生物学会、2011 年 6 月 28 日、札幌

〔図書〕(計 2 件)

伊集院 壮、竹縄 忠臣、羊土社、「イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 (リン脂質シグナリング)」、2012、350 ページ、31-34  
伊集院 壮、羊土社、「改訂タンパク質

実験ハンドブック（酵素活性測定法・タンパク質の培養細胞への導入法・タンパク質複合体の解析①）、2011、298ページ、143-153、224-227、281-284

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/icms/icms/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊集院 壮 (IJUIN TAKESHI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00361626